As "MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN" têm por finalidade a apresentação de trabalhos originais que contribuam para o progresso nos campos das Ciências Biológicas, Médicas e Químicas, elaborados por especialistas nacionais e estrangeiros.

São publicadas sob a orientação da Comissão Editorial, sendo que os conceitos emitidos são de inteira responsabilidade dos autores.

The "MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN" are the vehicle of communication for original papers written by national and foreign specialists who contribute to the progress of Biological, Medical and Chemical Sciences.

They are published under the direction of the Editorial Board which assumes no responsibility for statements and opinions advanced by contributors.

Indexado/Indexed: Biosis Data Base, Current Contents, Index Medicus.

Periodicidade: irregular
Permuta/Exchange: são feitas entre entidades governamentais, com publicações congêneres, mediante consulta prévia. Exchanges with similar publications can be settled with academic and governmental institutions through prior mutual agreement.
Endereço/Address. Instituto Butantan — Biblioteca. Av. Vital Brasil, 1.500
05504 — São Paulo, SP — Brasil
Telefone/Telephone: (011) 813-7222 — R. 129 — Telex: (011) 83325 BUTA-BR
Telefax: (011) 815-1505

Mem. Inst. Butantan
52 (2), 1990

SUMÁRIO/CONTENTS

Mem. Inst. Butantan
52 (2): 37-46, 1990

CONTROLE DE QUALIDADE DO ONCO-BCG ORAL: CONTRIBUIÇÃO DO TESTE BIOLÓGICO PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIGÊNICO

José Luiz Bernardino MERUSSE*
Idércio Luiz SINHORINI*
Maria Christina GAVIOLLE*
Gilda Almeida de SOUZA**

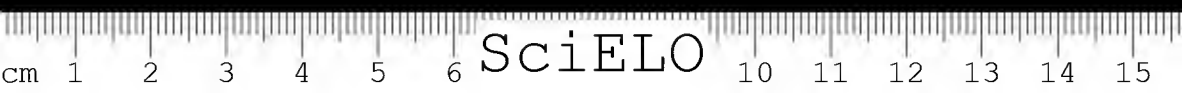
RESUMO: O processo de controle de qualidade do ONCO-BCG Oral inclui testes de curta e longa duração. O produto é liberado para o consumo após o resultado das provas de bacterioscopia, consumo de oxigênio e esterilidade. Essas provas asseguram um produto constituído por uma suspensão de bacilos álcool-ácido resistentes, dispersos, vivos e sem a presença de contaminantes. Por outro lado, essas provas por si só não são suficientes para caracterizar um produto imunoestimulante. Essa propriedade está intimamente relacionada aos componentes lipídicos da parede bacteriana, os quais são capazes de induzir a formação de uma resposta inflamatória granulomatosa no coxim plantar de hamsters. O presente trabalho sugere um teste de controle de qualidade do ONCO--BCG Oral, que avalie seu potencial imunoestimulante pelo acompanhamento das lesões induzidas no hamster, caracterizando, assim, uma prova biológica de controle de qualidade.

UNITERMOS: BCG; neoplasias, tratamento adjuvante; inflamação granulomatosa.

INTRODUÇÃO

A forma atenuada de *Mycobacterium bovis*, o Bacilo de Calmette Guerin (BCG) tem sido amplamente empregada como terapia coadjuvante no tratamento de diversos tipos de neoplasias[3,4,6,7,8,11,13,24,27].

Destacamos, em particular, o tratamento do melanoma maligno, para o qual altas doses do BCG são administradas pela via oral[17,26,34]. Essa

* Departamento de Patologia. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Cidade Universitária. 05508 — São Paulo — SP — Brasil.
** Seção de Tuberculose e BCG. Instituto Butantan.
Recebido para publicação em 04.9.1989 e aceito em 23.4.1990.

capacidade antineoplásica, exercida através de complexa interação com células do sistema imune, caracteriza o BCG como um imunoestimulante não específico, capaz de ativar direta ou indiretamente os diversos componentes do sistema[5].

Existem, porém, diferenças quantitativas, em termos da capacidade imunoestimulante, entre as diferentes cepas e preparações. Dentre as várias cepas testadas por Mackaness & Cols.[18], a cepa Pasteur demonstrou maior capacidade imunoestimulante que a cepa Glaxo. Além disso, os autores notaram que o BCG em fase estacionária, nas vacinas liofilizadas, provoca menor resposta que o proveniente diretamente das culturas em fase logarítmica. Várias observações evidenciaram, também, que na imunopotenciação pelo BCG, a presença da bactéria viva nos tecidos linfóides tem um papel preponderante[12,22]. A inoculação, em camundongos, de amostras de BCG submetidas ao tratamento por ultra-som, apresentando portando baixo grau de agregação entre as partículas, induz a formação de anticorpos duas vezes maior, quando comparadas com amostras não submetidas ao referido tratamento[2].

Independentemente dos fatores acima citados, a atividade imunoestimulante do BCG está relacionada aos componentes lipídicos da bactéria[28,36], sendo que a maior parte destes, se não todos, fazem parte da parede bacteriana[14]. Esse fato pode ser demonstrado pela análise do padrão inflamatório e imunológico, decorrente da inoculação de BCG desprovido de glicolipídios na parede celular. O BCG delipidado provoca uma resposta inflamatória de caráter agudo. Além disso, quando privado de seu componente glicolipídico, o bacilo perde sua capacidade imunoestimulante[29].

Além de seu efeito potenciador sobre o sistema imune, destacamos o uso do BCG no estudo da relação parasita-hospedeiro, tema sobre o qual temos desenvolvido diversos experimentos em nosso laboratório[15,21,30]. As micobactérias induzem um tipo específico de resposta inflamatória crônica denominada granulomatosa[1,20,31]. Particularmente, no estudo das lesões e imunologia da tuberculose, bem como no estudo de uma reação inflamatória granulomatosa, o hamster tem sido um dos modelos de escolha pois é sensível ao BCG, o qual, na dependência da dose e da via de inoculação, pode levar o animal à morte[9]. Histologicamente, as lesões induzidas pelo BCG no hamster são semelhantes às decorrentes da infecção desses animais pelo bacilo humano ou bovino da tuberculose[23], inclusive com a presença de células epitelióides, característica básica da lesão granulomatosa[20].

O presente trabalho sintetiza alguns anos de utilização do ONCO-BCG Oral, em especial quanto à sua capacidade de indução de lesão granulomatosa no hamster. Através desse modelo, sugerimos uma prova biológica para controle de qualidade do produto.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais: Foram utilizados hamsters (*Mesocricetus auratus*, variedade golden), machos. Os animais foram criados e mantidos em biotério tipo convencional recebendo água e ração peletizada ''ad libitum''. Esses animais foram originados pelo sistema não consangüíneo de acasalamento.

Ao longo do experimento, 137 grupos de 10 animais foram mantidos em caixas convencionais de polipropileno com aproximadamente 1140cm^2 de piso. Estabeleceu-se que o peso dos animais no início do experimento seria de 100 a 110g.

Inóculos: Utilizou-se o ONCO-BCG Oral na concentração de 100mg/ml em meio de Sauton, Cepa Moreau, obtido do Instituo Butantan de São Paulo (IB), preparado e submetido a provas de controle de qualidade conforme normas padronizadas[32,35]. As inoculações foram realizadas com partidas recém-fabricadas, logo após a liberação pelo Instituto. Foram utilizadas, no total, 136 partidas de ONCO-BCG Oral, no período compreendido entre 1984 e 1988.

Após agitação do flaconete, o produto foi inoculado no tecido conjuntivo subcutâneo do coxim plantar esquerdo na dose de 0,1ml (10mg). Durante o procedimento o produto foi mantido em recipiente original, resfriado a 4°C.

O meio de Sauton foi também inoculado em um lote de 10 animais, na concentração e sob as mesmas condições como empregado para a fabricação do ONCO-BCG Oral. O referido meio foi também cedido pelo IB.

As inoculações foram feitas com agulhas tipo tuberculina (13x4 ou 27G 1/2).

Acompanhamento das provas de controle de qualidade: As partidas de ONCO-BCG Oral por nós inoculadas foram acompanhadas no referente ao controle de qualidade efetuado pelo IB, pelas provas de bacterioscopia, consumo de oxigênio, esterilidade, vitalidade e inocuidade. Os resultados dessas provas foram-nos fornecidos pelo referido Instituto.

AVALIAÇÃO DAS LESÕES:

1. Mensuração — As lesões induzidas pela inoculação do produto foram avaliadas pela mensuração do diâmetro do coxim plantar. Utilizando-se micrômetro marca Moore & Wrigth, mediu-se a distância entre a face superior e a inferior da pata. As medidas foram tomadas a intervalos de 24 ou 72 horas a contar do momento da inoculação. Para todas as mensurações observou-se intervalos de centésimos de milímetro. Os animais foram marcados de modo a propiciar registro individual. Os valores em mm obtidos das mensurações foram registrados em Tabelas. As médias obtidas dos grupos de animais a cada intervalo de tempo foram, por sua vez registrados em gráficos. Os grupos foram acompanhados por períodos que variaram de 20 a 60 dias.

2. Ultraestrutura — para a visualização ultraestrutural do estado geral do inóculo do coxim plantar de hamsters, fragmentos representativos foram coletados 20 dias após a inoculação, fixados em uma solução de glutaraldeído a 2% em tampão fosfato 0,1M, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1%[10] e incluídos em Araldite 502[16].

Os cortes ultra-finos (60-70 mm de espessura), foram obtidos com navalhas de vidro, através da utilização do ultramicrótomo Sorvall MT-5000, contrastados pelo acetato de uranila[37] e citrato de chumbo[25] e visualizados ao Microscópio Eletrônico de Transmissão EM 201, Phillips.

3. Análise estatística — As 136 partidas de ONCO-BCG Oral foram analisadas pela intensidade da lesão induzida no coxim plantar de hamsters.

MERUSSE, J. L. B.; SINHORINI, I. L.; GAVIOLLE, M. C.; SOUZA, G.A. de. Controle de qualidade do ONCO-BCG oral; contribuição do teste biológico para avaliação do potencial antigênico. Mem. Inst. Butantan, 52(2): 37-46, 1990.

Após a avaliação das lesões, conforme descrito no item 1 estas foram estatisticamente comparadas pela utilização do teste "t" Student[33]. A hipótese alternativa pressupunha as médias de um grupo como sendo inferiores às médias de outro grupo. Estabeleceu-se valor de 0,05 para o nível de rejeição da hipótese de nulidade.

RESULTADOS

Resultados das provas de controle de qualidade: Os resultados das provas de controle de qualidade efetuadas nas partidas por nós inoculadas, mostraram-se dentro dos padrões exigidos para o produto[32] não sendo constatadas quaisquer anormalidades.

Resultado da inoculação do meio de Sauton: O meio de Sauton não foi capaz de induzir qualquer alteração mensurável no coxim plantar dos animais. O aumento de volume foi decorrência da própria inoculação. Transcorrido um período de 24 horas, as medidas retornaram ao nível basal, após o que não se registraram quaisquer alterações mensuráveis.

Características da evolução da lesão granulomatosa induzida pelo ONCO--BCG Oral no coxim plantar de hamsters: Com o acompanhamento das diversas inoculações do ONCO-BCG Oral no coxim plantar do hamster, estabeleceu-se um padrão evolutivo básico e característico desse tipo de resposta inflamatória granulomatosa. Logo após a inoculação, iniciou-se a fase aguda com a absorção do componente líquido do inóculo. Avante essa fase, que perdurou até 4 ou 6 dias após a inoculação, notou-se, macroscopicamente, a diminuição do volume lesional. partir desse ponto, ou em período próximo, teve lugar a fase de proliferação e organização celular formando a lesão granulomatos característica da resposta do hospedeiro às micobactérias. Durante esse período notou-se um crescente aumento no volume local. Seguiu-se a essa fase uma outra também característica de uma lesão granulomatosa, qual seja, a de um relativo equilíbrio com o hospedeiro, e que perdurou por todo o tempo observado (60 dias em alguns casos). Nessa terceira fase, que teve início após o 14º ou 16º dia após a inoculação, o diâmetro médio do coxim plantar situou-se entre 6 e 7mm. À lesão acima descrita convencionou-se chamar de padrão clássico de resposta granulomatosa desenvolvida no coxim plantar do hamster ao ONCO-BCG Oral e está ilustrada no conjunto A da Figura 1. A grande maioria das partida inoculadas desenvolveu resposta inflamatória que se enquadrou nesse padrão. Não foram constatadas diferenças estatiscamente significativas entre as diversas médias do conjunto A para um mesmo intervalo de tempo.

Por outro lado, registraram-se outros padrões de evolução das lesões de coxim plantar em resposta à inoculação de determinadas partidas de ONCO-BCG Oral. Constituíram-se em padrões anômalos, quando comparados ao conjunto anteriormente descrito, sendo, por isso, incluídas no Conjunto B da Figura 1. Nesse caso, o único padrão comum a todas as respostas foi a sua menor intensidade. Em alguns casos, o único aumento de volume registrado foi aquele decorrente da própria inoculação; após o período de absorção do componente líquido do inóculo, as medidas retornaram ao nível basal, não sendo verificadas, posteriormente, quaisquer alterações mensuráveis. Em outros casos a resposta inflamatória ocorreu, sendo, porém, menos intensa que aquela verificada com os inóculos do Grupo A.

MERUSSE, J. L. B.; SINHORINI, I. L.; GAVIOLLE, M. C.; SOUZA, G.A. de. Controle de qualidade do ONCO-BCG oral; contribuição do teste biológico para avaliação do potencial antigênico. Mem. Inst. Butantan, 52(2): 37-46, 1990.

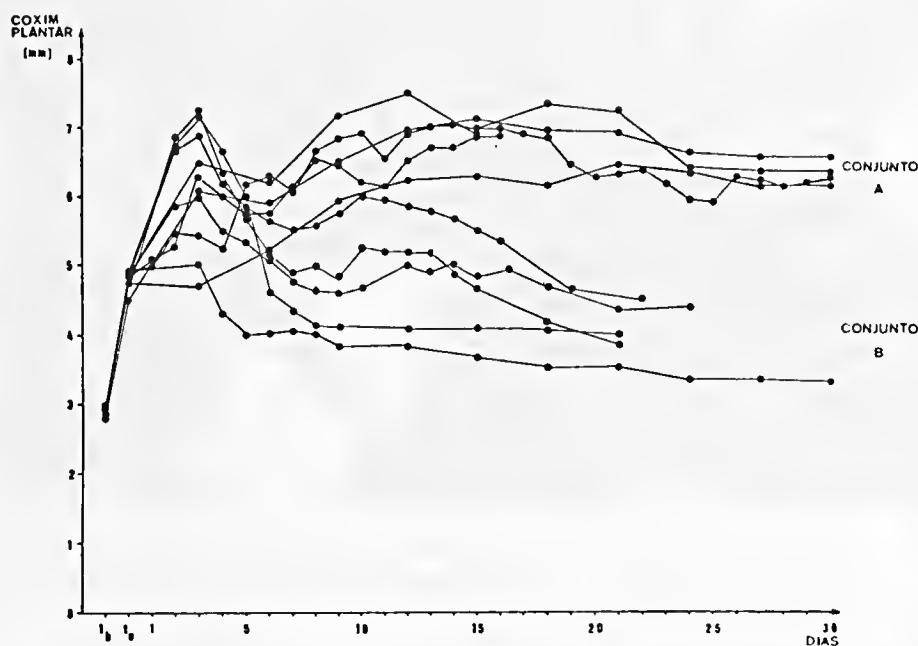



Figura 1. Curvas representativas da cinética da evolução das lesões induzidas pela inoculação de ONCO-BCG Oral no coxim plantar de hamsters. Cada ponto representa a média de 10 animais. Conjunto A. padrões clássicos de evolução; Conjunto B. padrões anômalos de evolução.

Análise ultra-estrutural das lesões induzidas pelo ONCO-BCG Oral no coxim plantar de hamsters: A análise ultra-estrutural dos sítios de inoculação dos bacilos das diferentes partidas de ONCO BCG Oral que desenvolveram no coxim plantar do hamsters padrões inflamatórios característicos do Conjunto A, expresso na Figura 1, apresentaram alta concentração de bacilos no interior do citoplasma das células inflamatórias presentes na lesão. Além disso, apresentaram esses bacilos morfologia característica. Essas observações sugerem um alto grau de multiplicação da micobactéria no interior das células inflamatórias. Essas células, por outro lado, apresentaram evidentes alterações, caracterizadas pelo comprometimento e desorganização da matriz intracitoplasmática, conforme mostra a Figura 2.

As células inflamatórias presentes nas lesões desenvolvidas em decorrência da inoculação do ONCO-BCG Oral proveniente das partidas cujo padrão inflamatório no coxim plantar do hamster foi classificado como anômalo (Conjunto B, Figura 1), deixaram evidente uma relativa integridade celular. Os poucos bacilos presentes na matriz citoplasmática pareciam fugir dos padrões de viabilidade, apresentando-se como pequenas massas eletron-densas, lembrando um estado de total desintegração (Figura 3).

MERUSSE, J. L. B.; SINHORINI, I. L., GAVIOLLE, M. C.; SOUZA, G.A. de. Controle de qualidade do ONCO-BCG oral; contribuição do teste biológico para avaliação do potencial antigênico. Mem. Inst. Butantan, 52(2): 37-46, 1990.

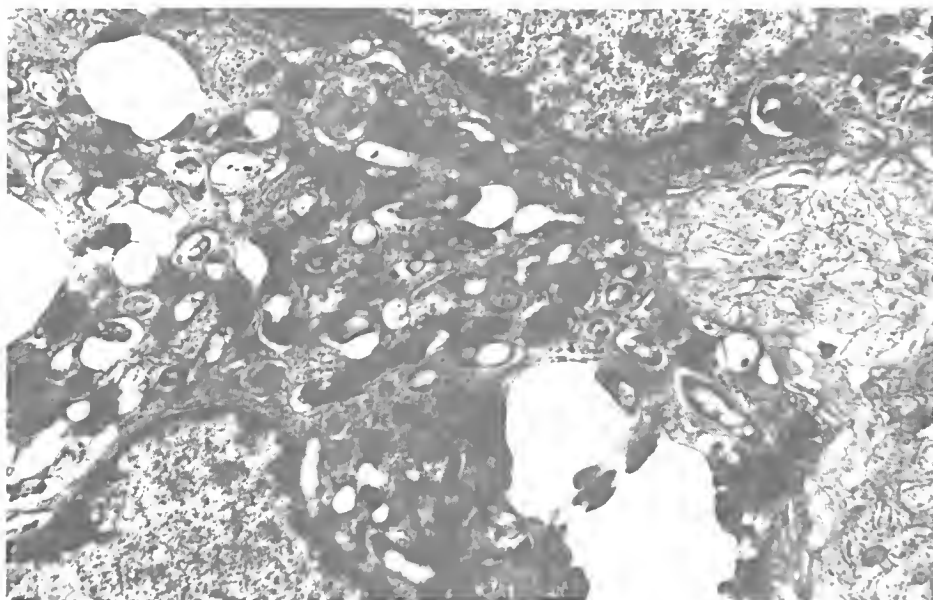



Figura 2. Micrografia eletrônica de célula inflamatória componente da lesão induzida pela inoculação de ONCO-BCG Oral no coxim plantar de hamsters. Notar a intensa multiplicação bacteriana e a conseqüente desorganização da matriz citoplasmática. Aumento (aproximado): 45.600 X.

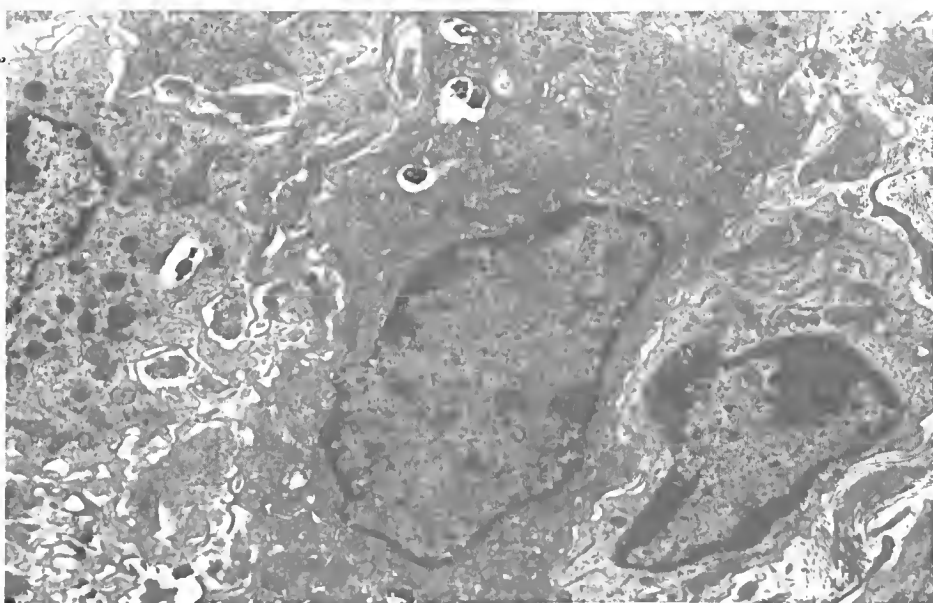



Figura 3. Micrografia eletrônica dé célula inflamatória componente de lesão induzida no coxim plantar de hamsters pela inoculação de ONCO-BCG Oral. Notar o comprometimento dos poucos bacilos existentes e matriz celular aparentemente íntegra. Aumento (aproximado): 14.600 X.

DISCUSSÃO

O processo de controle de qualidade do ONCO-BCG Oral é efetuado pelas provas de bacterioscopia, consumo de oxigênio, esterilidade, contagem de unidades viáveis (vitalidade) e inocuidade. A liberação do produto dá-se pelos resultados dos testes de bacterioscopia, consumo de oxigênio e esterilidade[32]. O teste de bacterioscopia constitui-se na execução dos métodos de Gram e Ziehl-Nielsen, através dos quais procede-se, respectivamente, à verificação da presença eventual de contaminantes e a identificação dos bacilos com as características tintoriais específicas. Além disso, essa prova permite a verificação do grau de dispersão entre as bactérias, fator importante na propriedade imunoestimulante de uma suspensão de BCG[2]. O teste de consumo de oxigênio assegura a presença de um número mínimo de bacilos vivos por unidade de volume. Esse dado reveste-se de importância, considerando-se que tanto maior será a capacidade imunoestimulante do BCG quanto menores forem as manipulações desde o meio de cultura até o hospedeiro[12,22].

O reduzido prazo de validade do ONCO-BCG Oral (25 dias), faz com que se tenha um também reduzido período disponível para a execução dos testes de controle de qualidade. Dessa forma, o produto é liberado para o consumo dispondo-se apenas de dados que assegurem as características acima mencionadas, quais sejam, uma suspensão dispersa de bacilos álcool-ácido resistentes, vivos e sem a presença de contaminantes.

A propriedade imunoestimulante do produto não pode, no entanto, ser detectada através das provas mencionadas. Comfirma esse fato ausência de correlação entre as provas de controle de qualidade e os padrões de evolução das lesões por nós observados: todas as partidas de ONCO-BCG Oral utilizadas mostraram-se dentro dos padrões para essas provas; determinadas partidas induziram respostas anômalas (Figura 1-B). Por outro lado, essa capacidade imunopotencializadora está limitada aos componentes lipídicos da parede micobacteriana, os quais são também os responsáveis pela indução da resposta inflamatória granulomatosa no hospedeiro[14,28,29,36].

Neste contexto, a avaliação das lesões granulomatosas induzidas no coxim plantar dos hamsters assume a configuração de uma prova biológica sensível para avaliar o potencial imunoestimulante do ONCO-BCG Oral.

A presença de bacilos álcool-ácido resistentes vivos, característica comum a todas as partidas de ONCO-BCG Oral estudadas não significa necessariamente capacidade imunoestimulante. O fato de que determinadas partidas de ONCO-BCG Oral tenham desenvolvido cinética lesional diferente do que estabelecemos como normal, indica uma drástica redução nos constituintes lipídicos da parede micobacteriana [28,29] e, conseqüentemente, da capacidade imunoestimulante dessas partidas.

A observação ultraestrutural dos componentes celulares das lesões foi suficiente para confirmar os dados obtidos pelo acompanhamento das lesões induzidas pelas diversas partidas de ONCO-BCG Oral. Micobactérias multiplicam-se no interior de células do hospedeiro, comprometendo-as estrutural e funcionalmente; já foi demonstrado que somente micobactérias íntegras em sua parede conseguem sobreviver e multiplicar nesse meio [29]. A concentração de bacilos íntegros no interior do citoplasma das células inflamatórias, bem como o comprometimento citoplasmático dessas,

conforme ocorrido em resposta a determinadas partidas de ONCO-BCG Oral, atestam a integridade dessas bactérias (Fig. 1-A; Fig. 2). Em contrapartida, bacilos de outras amostras de ONCO-BCG Oral, incapazes de provocar uma resposta inflamatória conforme os padrões clássicos no coxim plantar do hamster (Fig. 1-B) exibiram-se em baixo número e, ultraestruturalmente, em formas incompatíveis com a viabilidade no interior de células inflamatórias cuja morfologia correspondeu a um padrão aparentemente inalterado (Figura 3).

A simples comparação das mensurações das lesões do coxim plantar fornecem parâmetros suficientes para a avaliação do potencial antigênico e imunoestimulante do ONCO-BCG Oral. À semelhança das provas de vitalidade e inocuidade, a avaliação do potencial antigênico através da inoculação em hamster, também é um teste de longa duração, embora menos demorado que estes, sendo necessários apenas 15 dias para a constituição da celularidade característica de uma lesão granulomatosa. Em virtude da simplicidade do método e da importância dos resultados por ele fornecidos, consideramos viável sua aplicação periódica nos laboratórios de controle de qualidade de ONCO-BCG Oral.

AGRADECIMENTOS

À Diva Helena Melchiori Nogueira pelo excelente trabalho de datilografia.

ABSTRACT: The quality control process of oral ONCO-BCG includes short time and long time proofs. The product is released for use after results obtained in the following proofs: bacterioscopy, oxygem comsumption and sterelity these tests guarantee that the product's a contaminant — free suspension of disperse, live acid-fast bacilli. On the other hand, these assays alone are insuficient to characterize an immunostimulant product. This property is closely related to the fattyacid components of the bacteria's cell wall, witch can induce a granulomatous inflammatory response in the foot pad of hamster. The present study suggests a quality control test for Oral ONCO-BCG. Considering its immunostimulant properties through the kinetics of the lesions induced in hamsters thus establishing a biological quality control proof.

KEYWORDS: BCG; neoplasias, adjuvant treatment; granulomatous inflammation.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, D.O. The granulomatous inflammatory response. *Amer. J. Path., 84*:164-91, 1976.
2. BROWN, C.A. L. & BROWN, I.N. Mycobacterium bovis BCG modulation of murine antibody response: influence of dose and degree of aggregation of live or dead organisms. *Brit. J. Exp. Path., 63*: 133-43, 1982.
3. COMSTOCK, G.W. Leukaemias and BCG. A controlled trial. *Lancet, 2:*1062-3, 1971.
4. COMSTOCK, G.; MARTINEZ, I.; LIVESAY, V.T. Efficacy of BCG vacination in prevention of cancer. *J.Nat. Cancer Inst., 54*:835-9, 1975.
5. DAVIES, M. BCG as a anti-tumor agent. The interaction with cells of mammalian immune system. *Biochim.Biophis.Acta, 651*: 143-74, 1982.
6. DAVIGNON, L.; ROBILLARD, D.; LEMONDE, P.; FRAPIER, A. BCG vaccination and leukaemia mortality. *Lancet, 2*:638, 1970.

7. FARACI, R.P.; BARONE, J.J; MARRONE, J.C.; SCHOUR, L. In vitro evidence of specific BCG induced immunity to malignant melanoma in BALB/C mice. *J.Nat. Cancer Inst., 52:*1913-5, 1974.
8. FARACI, R.P. & SCHOUR, L. Malignant melanoma: specific immunity induced by BCG in BALB/C mice. *Science, 185:* 68-9, 1974.
9. HAUDUROY, P. & ROSSET, W. Sensibilité du hamster au bacille BCG. *Presse Med., 59*: 121, 1951.
10. HAYAT, M.A. *Fixation for Electron Microscopy*. New York, Academic Press, Inc., 1984. 501 p.
11. HUDSON, M.A.; RATLIEF, T.L.; GILLEN, D.P.; HAAF, E.O.; DRESNER, S.M.; CATALONE, W.J. Single course versus mantenaince BCG the rapy for superficial bladder tumors: A prospective, randomized trial. *J.Urol., 138*:295-8, 1987.
12. ISHIBASHI, T.; HARADA, Y.; HARADA, S.; YAMADA, H.; TAKAMOTO, M.; SUGYAMA, K. Mode of immunopotenciating action of BCG: Persistence and spread of BCG infection. *Jap.J.Exp.Med., 48*:227-32, 1978.
13. LAMM, D.L. Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy. *J.Urol., 138*: 291-2, 1987.
14. LEDERER, E. Structure de constituants mycobactériens: relation avec l'activité immunologique. *Ann.Microbiol.* (Inst. Pasteur), *129-A*: 91-3, 1978.
15. LOMBARDINI, F.; BOTTINO, J.A.; SINHORINI, I.L.; MERUSSE, J.L.B. GAVIOLLE, M.C.; GRECCHI, R. Preliminary study on a new immunostimulant by examining lymphatic cells formula and distribution in hamster. *Zoot. Intern., 10*:52-4, 1988.
16. LUFT, J.H. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem, Cytol., N. York, 9:* 409-17, 1961.
17. MAC GREGOR, A.B.; FALK, R.; LANDI, S.; AMBUS, U.; LANGER, B. Oral BCG immunostimulation in malignant melanoma. *Surg.Gynecol. Obstet., 141*:747-54, 1975.
18. MACKANESS, G.B.; AUCLAIR, D.J.; LAGRANE, P.H. Immunopotentiation with BCG. Immune response to different strains and preparations. *J.Nat. Cancer Inst., 51:*1655-67, 1973.
19. MARIANO, M. Functional caracterization and possible role played by E-macrophages (epitelioid cells) in experimental granulomas. In: WILLIAMS, W.J. & DAVIES, B.H. *Sarcoidosis and other granulomatous diseases.* Cardif, Alfa-Omega, 1980. p. 68-74.
20. MARIANO, M. The experimental granuloma. Em fase de redação.
21. MERUSSE, J.L.B. Influência do sexo e da gestação na cinética do granuloma experimental induzido pelo BCG no hamster. São Paulo, 1988. 66 p. Tese de Doutoramento — Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
22. NETTELESHIP, E.M.; COLLON, J.L.; LUM, G. Studies on the mechanism of BCG activation for immunotherapy. *Bol.Assoc.Med.P.Rico, 73:* 168-72, 1981.
23. NICOD, J.L. Hamster et BCG. *Rev. Immunol. (Paris), 19*:330-6, 1955.
24. PANSADORO, V. & De PAULA, F. Intravesical BCG in the treatment of superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *J.Urol., 138*:299-301, 1987.
25. REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pas an eletron opaque stain in electron microscopy. *J.Cell.Biol., 17*:208-13, 1963.
26. RODRIGUES NETTO JR.; REINATO, J.S.; TEIXEIRA, L.C.; DEBELLIS, N. Imunoterapia pelo BCG Oral no câncer da bexiga. *Rev.Ass.Med.Bras., 24*:358-60, 1978.
27. ROSENTHAL, S.R. BCG in cancer and leukaemia treatment and prophylaxis a review. *J.Med., 6*:193-212, 1975.
28. SILVA, C.L. Inflammation induced by mycolic acid-containing glycolipids of *M.bovis* (BCG). *Brit.J.Med.Biol.Res., 18*:327-35, 1985.
29. SILVA, C.L.; EKIZLERIAN, S.M.; FRAZIOLI, R.A. Role of cordfactor in the modulation of infection caused by mycobacteria. *Amer.J.Path., 118*:238-47, 1985.
30. SINHORINI, I.L. Formação do granuloma induzido pelo BCG no hamster. Influência da hipersensibilidade tardia e da administração do PPD na evolução e no número de bactérias das lesões. São Paulo, 1983, 84 p. Tese de Doutoramento — Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
31. SINHORINI, I.L. Comunicação Pessoal.
32. SOERENSEN, B.; PEREIRA, M.M.M.; SOUZA, G.A.; YAMAGUSHI, I.K.; SCALABRELLI, R. Normas para a preparação do BCG Oral destinado ao tratamento coadjuvante das neoplasias. *Vac. Soros, 1:* 64-70, 1985.

MERUSSE, J. L. B.; SINHORINI, I. L.; GAVIOLLE, M. C.; SOUZA, G.A. de. Controle de qualidade do ONCO-BCG oral; contribuição do teste biológico para avaliação do potencial antigênico. **Mem. Inst. Butantan, 52**(2): 37-46, 1990.

33. SPIEGEL, M.R. *Estatística*. São Paulo, McGraw-Hill, 1972. 580p.
34. VARELA, A.D.; BANDIERA, D.; AMORIM, A.R.; CALVIS, L.; SANTOS, I.O.; ESCALEIRA, N.; GENTIL, F. Treatment of disseminated malignant melanoma with high dose of oral BCG. *Cancer, 48:* 1353-62, 1981.
35. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tecnical Report Series, nº 638, Geneva, 1979.
36. WATSON, M.L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J.Biophys.Biochem.Cytol. (N.York),4:* 475-8, 1958.
37. YARKONI, E.; WANG, L.; BEKIERKUNST, A. Stimulation of macrophages by cordfactor and by heat killed and living BCG. *Inf.Immun., 16*: 1-8, 1977.

Mem. Inst. Butantan
52 (2): 47-52, 1990

DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO DE *TITYUS BAHIENSIS*: DADOS ADICIONAIS (SCORPIONES, BUTHIDAE)

Fabio A. MATTHIESEN

RESUMO: Exemplares de *Tityus bahiensis* (Perty, 1834) nascidos no laboratório foram criados nessas condições chegando quatro deles a passar pela 4ª ecdise. A 2ª muda ocorreu quando os jovens contavam entre 68 e 365 dias de idade, considerando-se 13 indivíduos; a 3ª, entre 299 e 429 dias, considerando-se 9. A 4ª, para 4 jovens, ocorreu respectivamente com as idades de: 631, 477, 443 e 440 dias. A idade máxima registrada foi 882 dias. São apresentadas medidas do comprimento total e do comprimento do dedo móvel dos pedipalpos de exúvias e de 6 exemplares.

UNITERMOS: Scorpiones, desenvolvimento pós-embrionário, *Tityus bahiensis*.

INTRODUÇÃO

O primeiro trabalho a se referir ao desenvolvimento pós-embrionário de *Tityus bahiensis* foi o de Piza[8], em que esse aspecto foi tratado de modo muito breve. Os de Matthiesen[4,5,6] foram mais amplos nesse sentido e basearam-se em observações sobre exemplares nascidos e criados em cativeiro, estando depois dos de Schultze[9], Angermann[1] e Auber[2], entre os primeiros efetuados em escorpiões.

Com o intuito de conseguir novos dados, além dos contidos nos trabalhos sobre *T. bahiensis* acima mencionados, fiz outras tentativas cujos resultados constituem o objeto deste artigo.

MATERIAL E MÉTODOS

As 18 fêmeas de *Tityus bahiensis* (Perty, 1834) foram coletadas em Rio Claro (SP) e cidades próximas. Serviram como terrários, cristalizado-

Departamento de Zoologia. Instituto de Biociências. UNESP - Campus de Rio Claro, CP 178 - 13.500 - Rio Claro - SP.
Recebido para publicação em 5.5.1988 e aceito em 24.4.1990.

res de 25cm de diâmetro por 10cm de altura, com tampa de tela, preparados de maneira semelhante à já descrita (Matthiesen[4], isto é, com fundo coberto de terra, cacos de telha para abrigo e uma placa de Petri com água e cacos de telha. Os escorpiões permaneceram em quarto escuro, levemente aquecido nos dias mais frios. As temperaturas máximas variaram de 16°C a 32°C, as mínimas de 12°C a 28°C e a umidade relativa, de 80% a 96% e 48% a 74%. Exemplares de *Periplaneta americana* serviram como alimento, sendo utilizados para os jovens, pedaços dessas baratas ou ninfas pequenas. Após abandonarem a mãe, os filhotes foram alojados em cristalizadores comuns e separados em frascos individuais, à medida que passavam pela segunda ecdise. Ouanto à identificação das fêmeas, o primeiro número empregado indicava o ano de coleta; o segundo,o exemplar propriamente. Os números das fêmeas, acrescidos de uma letra, serviram para identificar os jovens (Tabelas I e II).

Sempre que possível, as exúvias e os exemplares mortos foram guardados e posteriormente examinados. O comprimento total foi medido com compasso e o do dedo móvel, sob lupa, com ocular micrométrica.

RESULTADOS

Onze fêmeas deram à luz uma só vez em cativeiro; três, duas vezes e quatro, três vezes. Ouatro jovens não ultrapassaram a 2ª ecdise, nove atingiram a 3ª e quatro a 4ª (Tabela I). O total de partos foi, portanto, 29, e o de filhotes recém-nascidos, aproximadamente 220.

Considerando-se 13 indivíduos, a 2ª ecdise ocorreu quando tinham em média, 199,8 dias de idade. Ouanto à 3ª ecdise, os extremos foram 299 e 429, sendo a média 343,5 dias, considerando-se 9 exemplares. A 4ª, para quatro jovens, ocorreu quando contavam respectivamente, 631, 477, 443, 440 dias, a média sendo de 497,7 dias.

A Tabela II mostra medidas do comprimento total e do comprimento do dedo móvel do pedipalpo esquerdo de exúvias e de alguns escorpiões medidos depois de mortos.

Nenhum exemplar apresentou caracteres sexuais secundários de macho.

DISCUSSÃO

As contagens dos recém-nascidos foram aproximadas pois, contagens rigorosas exigiriam que eles fossem retirados das costas de suas mães.

No tocante às idades dos exemplares e suas respectivas ecdises, comparando-se entre si os dados da Tabela I, e estes, com os anteriormente obtidos (Matthiesen [4,5,6]) registraram-se em alguns casos enormes variações de um indivíduo para outro. Assim, por exemplo, na Tabela I, o exemplar 84/7a, mais precoce, passou pela 2ª ecdise com 68 dias de idade, enquanto 84/6d, mais tardio, o fez com 375. Considerando-se todos os dados disponíveis neste e em outros trabalhos já citados, as idades extremas registradas foram: 2ª ecdise, 38 — 375; 3ª, 117 — 429; 4º, 194 — 631. Os exemplares cujas idades foram 375 dias para 2ª ecdise, 429, para 3ª e 631, para 4ª (Tabela I), foram os mais tardios conhecidos até agora. Um indíviduo mencionado em outro trabalho (Matthiesen [5]), passou pela 3ª ecdise com a idade de 586 dias, tempo este superior ao máximo acima indicado. Fora, porém, submetido a outras experiências, o que pode ter retardado a ocorrência do processo.

TABELA I

Tityus bahiensis. Exemplares nascidos e criados em cativeiro. Datas em que exuviaram e duração total de cada exemplar. As colunas encimadas por i.d. indicam a idade do exemplar (em dias) quando ocorreu o acontecimento indicado na coluna situada imediatamente à esquerda.

Exemplar	Nascimento	2ª. ecdise	i.d.	3ª. ecdise	i.d.	4ª. ecdise	i.d.	Morte	i.d.
83/2a	02.03.83	14.10.83	196	26.12.83	299	—	—	27.12.83	300
83/4a	07.03.83	26.11.83	264	09.05.84	429	—	—	07.02.85	703
83/4b	07.03.83	11.12.83	277	—	—	—	—	12.01.84	309
84/2a	25.02.84	05.11.84	254	25.02.85	366	22.11.85	631	26.07.86	882
84/3a	10.03.85	13.09.85	187	—	—	—	—	30.09.85	204
84/4a	19.11.84	13.03.85	114	—	—	—	—	02.07.85	225
84/4b	19.11.84	10.04.85	142	30.10.85	345	11.03.86	477	11.03.86	477
84/6a	05.04.85	09.10.85	187	14.02.86	315	—	—	11.09.86	527
84/6b	05.04.85	15.11.85	224	04.03.86	333	—	—	09.12.86	613
84/6c	05.04.85	21.11.85	230	28.03.86	357	—	—	14.07.86	465
84/6d	05.04.85	15.04.86	375	—	—	—	—	—	—
84/7a	25.01.85	03.04.85	68	24.12.85	333	13.04.86	443	25.09.86	608
84/7b	25.01.85	15.04.85	80	06.12.85	315	10.04.86	440	06.10.86	618

MATTHIESEN, F. A. Desenvolvimento pós-embrionário de *Tityus bahiensis*; dados adicionais (Scorpiones, Buthidae). **Mem. Inst. Butantan, 52**(2):47-52, 1990.

TABELA II

Tityus bahiensis. Medidas do comprimento total e do comprimento do dedo móvel do pedipalpo esquerdo das exúvias e de seis exemplares.

	Comprimento total e comprimento do dedo móvel em mm							
Exemplar	2ª ecdise		3ª ecdise		4ª ecdise		Exemplar (após morte)	
83/2a	24	3,2	30	4,0	34	4,8	48	6,0
83/4a	22	3,2	27	4,0	—	—	—	—
83/4b	—	—	25	3,3	—	—	—	—
84/2a	22	3,0	27	3,8	—	—	—	—
84/3a	20	2,8	—	—	—	—	—	—
84/4a	20	3,1	—	—	—	—	—	—
84/4b	19	3,0	25	3,6	—	—	30	4,4
84/6a	21	3,0	25	3,6	—	—	27	3,9
84/6b	20	3,0	24	3,5	—	—	30	4,5
84/6c	20	2,9	27	3,7	—	—	—	—
84/6d	20	2,8	—	—	—	—	—	—
84/7a	22	3,1	27	3,8	34	4,8	51	5,9
84/7b	22	3,0	24	3,5	30	4,5	50	5,7

Embora o comprimento total varie devido à segmentação, as medidas obtidas dão, mesmo assim, uma idéia do tamanho. As medidas do dedo móvel são mais exatas por se tratar de uma estrutura única, não sujeita a tais variações.

Os dados aqui presentes são insuficientes para uma conclusão definitiva. As médias, particularmente, foram tomadas com base em poucos números e não são, reconheço, suficientemente significativas. Como estas informações e as resultantes de meus estudos anteriores são as únicas existentes sobre desenvolvimento pós-embrionário de *T. bahiensis,* novos e mais completos estudos serão necessários para o conhecimento desse assunto. A grande mortalidade de jovens desta espécie nas criações em cativeiro é, indubitavelmente, uma grande barreira, razão pela qual, de cerca de 220 indivíduos, apenas 13 foram acompanhados. No que diz respeito à manutenção em laboratório, talvez a alta taxa de mortalidade possa ser compensada com a criação de um número mais elevado de ninhadas. Por outro lado, levando-se em conta a quantidade de partos e o número de filhotes por ninhada (Matthiesen [5]), poder-se-ia supor que os adultos, embora não raros, deveriam ser bem mais comuns na natureza. Não fiz e não conheço nenhuma observação específica sobre isso. Mas, sou levado a acreditar que a taxa de mortalidade entre filhotes é elevada também entre indivíduos não cativos. Um estudo mais aprofundado nesse sentido seria altamente desejável. Resta ainda responder à pergunta: ''até onde os resultados obtidos com escorpiões cativos correspondem ao que ocorre com os que vivem em liberdade?''. Já Maccary [3] chamara a atenção para esse ponto quando, em suas palavras, citadas também por Millot & Vachon, [7], disse: ''Aucun insecte, dans l' immense République de la Nature n' aime sa liberté avec plus d'ardeur que le Scorpion...''

AGRADECIMENTOS

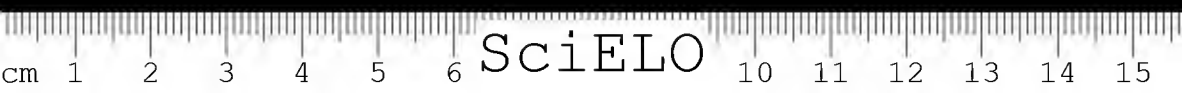
Agradeço à Dra. Sylvia M. Lucas, Diretora da Divisão de Biologia do Instituto Butantan, pela leitura crítica do texto.

ABSTRACT: Individuals of *Tityus bahiensis* (Perty, 1834) which were born in the laboratory, were kept on these conditions.
Second molt took place when the scorpions were between 68 and 375 days old, considering 13 individuals; third molt, between 299 and 429 days old, considering 9. Four individuals reached fourth ecdysis at the ages of 631, 477, 443 and 440 days respectively. The largest age recorded was 882 days.
Measurements of total length and of the movable pedipalp fingers length are presented.

KEYWORDS: Scorpiones, post-embryonic development, *Tityus bahiensis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANGERMANN, H. Über Verhalten, Spermatophorenbildung und Sinnesphysiologie von *Euscorpius italicus* Host und verwandten Arten (Scorpiones, Chactidae). *Zeitschrift Tierpsychologie, 14*(3): 276 — 302, 1957.
2. AUBER, M. Observations sur le biotope et la biologie du scorpion aveugle: *Belisarius xambeui* E. Simon. *Vie et Milieu, 10*(2): 160 — 167, 1959.
3. MACCARY, A. *Mémoire sur le scorpion qui se trouve sur la montagne de Cette.* Paris, Gabon édit., 1810. 48p.

MATTHIESEN, F. A. Desenvolvimento pós-embrionário de *Tityus bahiensis*; dados adicionais (Scorpiones, Buthidae). **Mem. Inst. Butantan, 52**(2):47-52, 1990.

4. MATTHIESEN, F.A. Notas sobre escorpiões. *Rev. Agric., 36*(3): 139 — 147, 1961.
5. MATTHIESEN, F.A. Aspectos morfológicos e biológicos dos escorpiões. São Paulo, 1966. 115p. (Tese de Doutoramento — Faculdade de Filosofia Ciências e Letras — USP).
6. MATTHIESEN, F.A. Le développement post-embryonnaire du scorpion buthidae: *Tityus bahiensis* (Perty, 1834). *Bull. Mus. Nat. Hist. natur., 2e sér., 41*(6): 1367 — 1370, 1969.
7. MILLOT, J. & VACHON, M. Ordre des scorpions. In: Grassé, P.P. *Traité de Zoologie.* Paris, Masson et Cie édit., 1949, v. 6, p. 386-436.
8. PIZA JR, S. de T. Estudos anatômicos em escorpiões brasileiros. III — A) *Tityus bahiensis.* Parição, variação da posição do umbigo dorsal, número de filhotes e de embriões, primeira muda... *Rev. Agric., 15*(5/6): 214-228, 1940.
9. SCHULTZE, W. Biology of the large Philippine forest scorpion. *Philip. J. Sci., 33*(3): 375 — 390, 1927.

Mem. Inst. Butantan
52 (2): 53-56, 1990

ON THE IDENTITY OF *DENDROBATES QUINQUEVITTATUS* (ANURA: DENDROBATIDAE)

Marcio MARTINS*
Célio F. B. HADDAD**

ABSTRACT: We call attention to the wrong usage of the name *Dendrobates quinquevittatus*. Specimens from Samuel, State of Rondônia, Northern Brazil, 150km from the type locality, fit perfectly the original description of *D. quinquevittatus* and differ in several features from those specimens currently referred to as *D. quinquevittatus* in the literature.

KEYWORDS: Taxonomy; Amphibia: Dendrobatidae; *Dendrobates quinquevittatus*.

INTRODUCTION

Steindachner[8] described with many details the color pattern of a small dendrobatid collected at Salto do Girao (= Jirau), Rio Madeira, Rondônia, Brazil, by J. Natterer in the beginning of the past century, and named it *Dendrobates tinctorius* var. *quinquevittatus*. The name *quinquevittatus* was extracted from a L. J. Fitzinger label. Lutz and Kloss[4] used the name *quinquevittatus* for some small, striped dendrobatids from the upper Amazonas region, identified by E. R. Dunn. Silverstone[7] reviewing the genus *Dendrobates* used the name *quinquevittatus* for several small specimens with distinct color patterns in a conservative way, since some species of this genus are actually very variable in color and color pattern. Lescure and Bechter[3] applied the name *quinquevittatus* to several specimens from Amazonia and briefly commented the polymorphism in some populations. Myers[6], in a partial revision of the *quinquevittatus* group, removed two species from the synonymy of *D. quinquevittatus* and described three new species.

* Departamento de Zoologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6109, 13081 — Campinas — SP, Brasil.
** Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Caixa Postal 178, 13500 — Rio Claro — SP, Brasil.
Recebido para publicação em 5.2.1990 e aceito em 25.4.1990.

MARTINS, M. & HADDAD, C. F. B. On the identity of *Dendrobates quinquevittatus* (Anura: Dendrobatidae). **Mem. Inst. Butantan, 52**(2): 53-56, 1990.

The purpose of this note is to call attention for the wrong usage of the name *quinquevittatus*. Pending a revision of the *quinquevittatus* group by Myers[6], we briefly diagnose here some specimens from Samuel, 150 km from Salto do Jirau, and compare them to information in the literature concerning specimens referred to as *D. quinquevittatus*.

MATERIAL AND METHODS

Recently we had the opportunity to examine several live and preserved specimens of a *Dendrobates* from Samuel (8°46' S, 63°27' W), Rio Jamari, Rondônia, which fit Steindachner[8] description and illustration quite perfectly, and also the illustrations of the holotype of *D. quinquevittatus* provided by Silverstone[7]. These specimens from Samuel differ in several features from those currently referred to as *D. quinquevittatus* in the literature (e.g., Plate 1 in[2]; Figures 4-8 in [3]; Figures 1A and 7B in [6]; Frontispice II in[7]).

Measuring procedures are those of Myers[6]. Specimens examined are: ZUEC (Museu de História Natural, Universidade Estadual de Campinas) 7815-7826; MNRJ (Museu Nacional do Rio de Janeiro) 4995 and 4996.

RESULTS

Dendrobates quinquevittatus Steindachner, 1864.

Dendrobates tinctorius var. *quinquevittatus* Steindachner, 1864:261, plate XV, Figure 2, holotype: NHMW (Naturistorisches Museum, Vienna) 16517, Salto do Girao, Brasil.

Dendrobates quinquevittatus (part.). Silverstone, 1975:33, Figures 12A and 14D. (Only the holotype of *D. quinquevittatus)*.

Diagnosis. A small *Dendrobates* (15.9-18.9mm snout-vent length considering both sexes) with slightly granular skin (Figure 1). Large finger discs; second finger slightly longer than first. In life, greenish to yellowish white middorsal, dorsolateral, and lateral stripes on deep black dorsum and flanks. Limbs brownish yellow with scattered and variable sized, small black spots. The spots are less numerous on hands, feet, and ventral surfaces of the limbs, which are less brownish than the dorsal surfaces. Metallic, golden orange "flash" marks in the axila and groin. Venter with variable sized and shaped, deep black blotches on a greenish to yellowish white ground (see a color photograph of a specimen of *D. quinquevittatus* from Samuel in [5]). In preservative all colors, except black, fade to white. Measurements of 14 specimens from Samuel are presented in Table 1.

DISCUSSION

As mentioned above, the specimens of *D. quinquevittatus* from Samuel perfectly fit Steindachner's[8] detailed original description and illustration. Larger size, limbs not reticulated, differences in, and little variation of, color and color pattern easily distinguish the specimens from Samuel from those referred to as *D quinquevittatus* by Lescure and Bechter[3], Lutz and Kloss[4], Myers[6], and Silverstone[7] (except the holotype of *D. quinquevittatus)*. The specimens found by Duellman[2] at Santa Cecilia, Ecuador, also have spotted limbs, but differ in all other features mentioned above. Considering these differences, we conclude that all these specimens are not *D. quinquevittatus* (except the holotype in[7]).

Identifying recently caught anurans by comparing them with the type-specimens is frequently a difficult task, since many types are from the

MARTINS, M. & HADDAD, C. F. B. On the identity of *Dendrobates quinquevittatus* (Anura: Dendrobatidae). **Mem. Inst. Butantan, 52**(2): 53-56, 1990.

TABLE 1

Means ($\bar{x}$) standard deviations (SD), and ranges for the measurements of 14 specimens of *Dendrobates quinquevittatus* from Samuel, Rondônia, Brazil. All measurements are in millimeters.

	$\bar{x}$	SD	range
snout-vent length	17.71	0.99	15.9-18.9
head width	5.46	0.21	5.0-5.8
head length	5.74	0.20	5.4 -6.1
thigh length	7.65	0.38	7.1-8.3
tibia length	7.68	0.26	7.3-8.1
feet length	7.07	0.26	6.8-7.6
hand length	4.43	0.19	4.2-4.9
eye diameter	2.03	0.11	1.8-2.2
tympanum diameter	0.98	0.10	0.8-1.1
eye to nostril distance	1.86	0.06	1.8-2.0
internarial distance	2.45	0.13	2.2-2.6

Fig. 1. A live specimen of **Dendrobates quinquevittatus** from Samuel, Rio Jamari, State of Rondônia, northern Brazil. Photo by I. Sazima.

past two centuries and, consequently, color, color pattern, and occasionaly morphology are in poor conditions. Misidentifications may be a common occurrence in such instances. Except for those species whose type localities are unknown, vague or wrong, the practice of looking for a species in its type locality has proven to be a valuable tool in solving problems of anuran proper identification[1].

RESUMO. Chamamos a atenção para o uso incorreto do nome *Dendrobates quinquevittatus*. Exemplares de Samuel, Estado de Rondônia, distante 150km da localidade-tipo, concordam perfeitamente com a descrição original de *D. quinquevittatus* e diferem em diversas características daqueles correntemente referidos como *D. quinquevittatus* na literatura.

UNITERMOS. Taxonomia; Amphibia: Dendrobatidae; *Dendrobates quinquevittatus*.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Radenka Batistic and Augusto Abe for the opportunity to examine live and preserved specimens from Samuel; Werner Bokermann and Ivan Sazima for helpful comments on earlier drafts of this manuscript.

REFERENCES

1. CARDOSO, A. J. & VIELLIARD, J. M. E. Caracterização de uma população topotípica de *Hyla rubicundula* (Amphibia, Anura). *Rev. bras. Zool., 2*:423-426, 1985.
2. DUELLMAN, W. E. The biology of an equatorial herpetofauna in Amazonian Ecuador. *Misc. Publ. Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas, 65*:1-352, 1978.
3. LESCURE, J. & BECHTER, R. Le comportement de reproduction en captivité et le polymorphisme de *Dendrobates quinquevittatus* Steindachner (Amphibia, Anura, Dendrobatidae) *Rev. Fr. Aquariol., 8*:107-118, 1981 (1982).
4. LUTZ, B. & KLOSS, R. Short notes on some frogs from the upper Amazonas and a few vicariant forms. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 50*: 629-678, 1952.
5. MARTINS, M. & SAZIMA, I. Dendrobatídeos: cores e venenos. *Ciência Hoje, 9* (53):34-38, 1989.
6. MYERS, C.W. Spotted poison frogs: descriptions of three new *Dendrobates* from western Amazonia, and resurrection of a lost species from "Chiriqui". *Am. Mus. Novit., 2721*:1-23, 1982.
7. SILVERSTONE, P. A. A revision of the poison-arrow frogs of the genus *Dendrobates* Wagler. *Nat. Hist. Mus. Los Angeles Co. Sci. Bull., 21*:1-55, 1975.
8. STEINDACHNER, F. Batrachologische Mittheilungen. *Verh. Zool. Bot. Ges. Wien, 14*:239-288, 1864.

Mem. Inst. Butantan
52 (2): 57-61, 1990

ESQUADRINHAR COM A CAUDA: UMA TÁTICA DE CAÇA DA SERPENTE *HYDRODYNASTES GIGAS* NO PANTANAL, MATO GROSSO

Christine STRÜSSMANN*
Ivan SAZIMA**

RESUMO: A serpente *Hydrodynastes gigas* foi observada forrageando em ambiente alagado no Pantanal, Mato Grosso. Na caça a anuros jovens, *Leptodactylus* sp.(Leptodactylidae), a serpente esquadrinha o substrato com a cauda. Essa tática pode ser considerada como uso de parte do corpo como método de caça. Repertório variado de táticas de caça pode ser freqüente entre serpentes facultativamente aquáticas, que vivem em ambientes fortemente influenciados por inundação sazonal.

UNITERMOS: História natural, comportamento alimentar, Colubridae.

INTRODUÇÃO

Hydrodynastes gigas (= *Cyclagras gigas*[5]) é uma serpente Colubridae de grande porte, até 250cm, hábitos semi-aquáticos e atividade diurna, que se alimenta basicamente de anfíbios e peixes [1,2]. Sua distribuição geográfica estende-se desde o Peru até o norte da Argentina, incluindo Bolívia, Paraguai, o sudeste e o oeste do Brasil[1,2].

Na parte norte do Pantanal, extensa planície inundável situada nos estados de Mato Grosso (MT) e Mato Grosso do Sul (MS), *H. gigas* é um dos ofídios avistados com maior freqüência. A denominação popular ''surucucu-do-Pantanal'', por vezes atribuída a esse colubrídeo [1,10] parece não ser empregada pelo homem pantaneiro da região de Poconé (MT), que a trata por ''jaracussu-piau'', ''jaracussu-do-brejo'' ou, simplesmente, ''jaracussu'' (observações pessoais).

Pouco há disponível, na literatura, sobre história natural de *H. gigas* e a maioria das informações está baseada em animais cativos, incluindo manutenção, alimentação e reprodução[2,3,8,10].

* Fundação Estadual do Meio Ambiente. 78000 Cuiabá — Mato Grosso
** Departamento de Zoologia, Universidade Estadual de Campinas, 13081 Campinas — São Paulo
Recebido para publicação em 27.3.1990 e aceito em 15.5.1990.

STRÜSSMANN, C. & SAZIMA, I. Esquadrinhar com a cauda: uma tática de caça da serpente *Hydrodynastes gigas* no Pantanal, Mato Grosso. **Mem. Inst. Butantan, 52**(2): 57-61, 1990.

Apresentamos aqui observações sobre a tática de esquadrinhar o substrato com a cauda, usada por *H. gigas* no Pantanal, durante caça a anuros de pequeno porte *(Leptodactylus* sp.).

PROCEDIMENTO

O trabalho de campo foi feito em maio de 1989, na Fazenda Santa Inês, região do Pantanal de Poconé, Mato Grosso (c. 16° 30' S, 56° 45' W). Dois indivíduos de *H. gigas* foram observados em duas ocasiões diferentes; um deles com 195cm de comprimento rostro-anal e outro com c. 200cm de comprimento total. As observações foram feitas por um de nós (CS), acompanhando a serpente enquanto em atividade de caça, na borda alagada de ''capões de acuris'' (Figura 1). Cada um desses capões constitui uma unidade fitofisionômica insular, florestal e de âmbito aproximadamente circular, formada por terras mais altas que o campo inundável adjacente. O ''acuri'' *(Sheelea phalerata,* Palmae) é a espécie dominante, havendo, em muitos capões, uma faixa periférica de gravatás *Bromelia sp.,* Bromeliaceae).

As áreas de gravatazal estavam semi-alagadas e serviam de abrigo a numerosos indivíduos jovens da rã *Leptodactylus* sp. (aff. *ocellatus),* Leptodactylidae, com c. 4cm de comprimento total. Coivaras e manchas densas de gravatás abrigavam maiores concentrações de rãs e, à passagem do observador, diversas dessas rãs saltavam nas poças rasas entre as plantas.

Fig. 1. Borda de um capão de acuris, ambiente usado por *Hydrodynastes gigas*, em área alagada no pantanal de Poconé, Mato Grosso. Em primeiro plano gravatás, *Bromelia* sp. (à direita) e folhas de acuri, *Sheelea phalerata* (acima); ao fundo, vista parcial de outros capões.

RESULTADOS

Dois indivíduos de *H. gigas* foram observados ativos em horas quentes do dia, entre 11:30 e 14:30h, a temperaturas do ar de 29-30°C e da água, 37-39°C.

Um dos indivíduos estava deslocando-se em meio a um gravatazal, progredindo de modo contínuo e esquadrinhando o substrato com o focinho. Por vezes, procurava sob a água rasa mas, com maior freqüência, pouco acima da superfície. No decorrer dessa atividade, o ritmo de emissão de língua (dardejar) era de 60-70/min. Ao longo do trajeto e, particularmente, em locais com maior concentração de *Leptodactylus* jovens, a serpente detinha-se por alguns momentos. Em duas dessas ocasiões, ficou estacionária, com o corpo e a cauda submersos e a cabeça emersa, elevada a poucos centímetros da superfície. Nessa postura movimentava o terço final do corpo e com a extremidade da cauda sondava diferentes locais do substrato circundante (Figura 2). Esses movimentos de cauda provocavam a fuga das rãs aí abrigadas, algumas das quais a serpente imediatamente percebia e procurava capturar, acompanhando os seus saltos com elevar e baixar de cabeça. Em sete investidas, a serpente apresou duas rãs (c. 30% de sucesso).

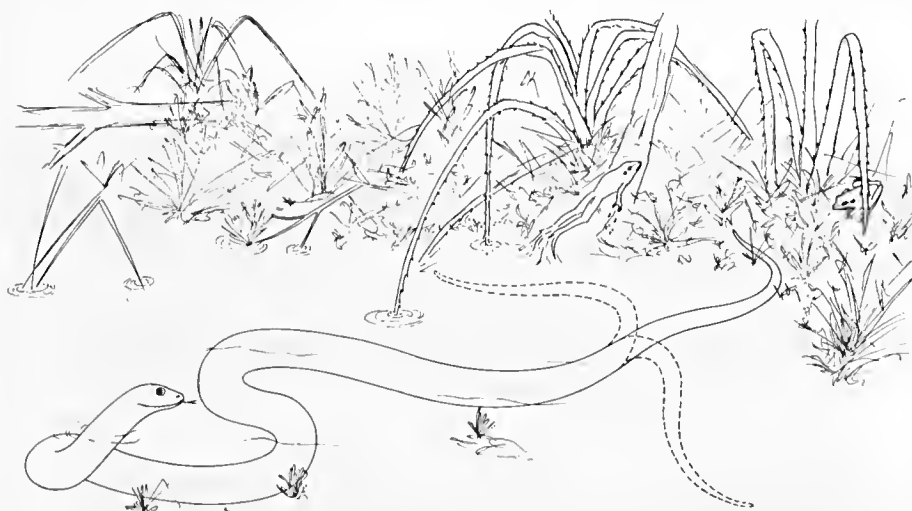



Fig. 2. *Hydrodynastes gigas* ao esquadrinhar o substrato com a cauda, durante caça a jovens de *Leptodactylus* sp., entre gravatás. O pontilhado representa duas das posições da cauda durante esse comportamento.

O segundo indivíduo percorreu cerca de 20m em meio ao gravatazal, caçando de modo semelhante ao primeiro. Em particular, apresentou o mesmo comportamento de esquadrinhar o substrato com a cauda, provocando a fuga de rãs jovens abrigadas na base dos gravatás, expondo-as assim às suas investidas.

DISCUSSÃO

O comportamento de usar a cauda para sondar o ambiente e espantar presas potenciais, observado em *Hydrodynastes gigas* durante a caça, parece constituir um caso adicional de uso dessa parte do corpo em táticas de caça. Outro exemplo é o comportamento de atrair presas com movimentos sinuosos da cauda (''caudal luring''), registrado principalmente para indivíduos jovens de Viperidae[7].

Em *H. gigas*, esquadrinhar com a cauda poderia estar relacionado à necessidade da presa estar em movimento para que a seqüência predatória seja eliciada[4]. Entretanto, essa serpente apresenta hábitos necrófagos[9] e, portanto, possui a capacidade de perceber e aproveitar animais imóveis. A tática aqui descrita possivelmente não é usada frente a outras presas (e.g. sapos, mussuns e outros peixes, roedores), das quais *H. gigas* se alimenta quando as bordas dos capões estão secas e as rãs jovens não estão presentes (observações pessoais).

Gillingham & Rush[6], ao registrarem comportamento oportunístico de pesca em *Natrix (= Nerodia)* spp., comentam que serpentes aquáticas parecem exibir métodos de caça não estereotipados, variando o comportamento em função do habitat. É provável que táticas variadas de caça também ocorram entre serpentes facultativamente aquáticas, que habitam áreas com grande variação sazonal do nível de água, como é o caso de *H. gigas* no Pantanal.

AGRADECIMENTOS

Somos gratos a Augusto S. Abe, Bill Magnusson e Márcio Martins, pelas críticas e sugestões ao manuscrito; a Oswaldo Cid, pelas facilidades na Faz. Santa Inês e pelo auxílio nos trabalhos de campo; a Esmeralda Z. Borghi, pelo acabamento do desenho original; ao CNPq (proc. 300992/79), pelo auxílio financeiro (IS).

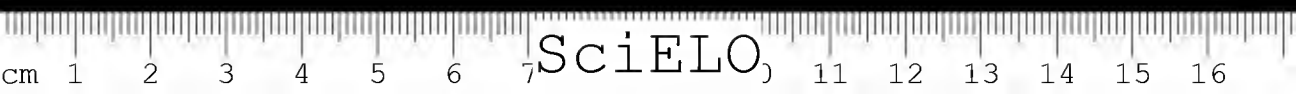
ABSTRACT: The colubrid snake, *Hydrodynastes gigas*, was observed while foraging in flooded habitats at the Pantanal in Mato Grosso, western Brazil. In shallow water near the shores this snake poked with its tail among bromeliad clumps, a favoured hiding-place of young *Leptodactylus* frogs. The poking behaviour often caused the frogs to flee, after which some of them were pursued by the snake. This tactic may be regarded as another instance of use of a bodily part as a hunting method (caudal luring is the best known example within this category). Varied foraging repertoire may be common among semiaquatic snakes living in seasonally flooded habitats.

KEYWORDS: Natural history, feeding behaviour, Colubridae.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMARAL, A. do. Serpentes do Brasil, iconografia colorida. São Paulo, Ed. Melhoramentos & Ed. Univ. São Paulo, 1977.
2. BELS, V.L. Observations of the courtship and mating behaviour of the snake *Hydrodynastes gigas*. *J. Herpetol.*, *21*:350-352, 1987.
3. CAMPBELL, J.A. & MURPHY, I.E. Reproduction of five species of Paraguayan colubrids. *Trans. Kansas Acad. Sci.*, *87*:63-65, 1984.

STRÜSSMANN, C. & SAZIMA, I. Esquadrinhar com a cauda: uma tática de caça da serpente *Hydrodynastes gigas* no Pantanal, Mato Grosso. **Mem. Inst. Butantan, 52**(2): 57-61, 1990.

4. CZAPLICKI, J.A. & PORTER, R.H. Visual cues mediating the selection of goldfish *(Carassius auratus)* by two species of *Natrix. J. Herpetol., 8*:129-134, 1974.
5. DOWLING, H.G. & GIBSON, F.W. Relationship of the neotropical snakes *Hydrodynastes bicinctus* and *Cyclagras gigas. Herp. Rev. 2*:37-38, 1970.
6. GILLINGHAM, J.C. & RUSH, T. Notes on the fishing behavior of water snakes. *J. Herpetol., 8*:384-385, 1974.
7. HEATWOLE, H. & DAVISON, E. A review of caudal luring in snakes with notes on its occurrence in the Saharan sand viper, *Cerastes vipera. Herpetologica, 32*:332-336, 1976.
8. HONEGGER, R. Beiträge zur Biologie von *Hydrodynastes gigas (Cyclagras gigas)* in Terrarium. *In*: BELS, V.L. & VAN DEN SANDE, A.P. ed. *Maintenance and reproduction of reptiles in captivity*. Antverps, *Acta Zool. Pathol. Antverpiensia, 1*:237-244, 1984.
9. SAZIMA, I. & STRüSSMANN, C. Necrofagia em serpentes brasileiras: exemplos e previsões. *Rev. bras. Biol., 50* (no prelo), 1990.
10. VOGEL, Z. Surucucu do Pantanal. *Aquar. Terrar. Zeitschr., 11*:178-181, 1958.

Mem. Inst. Butantan
52 (2): 63-68, 1990

ANÁLISE RADIOLÓGICA NA OFIOFAGIA DE FILHOTE DE SERPENTE *BOTHROPS ALTERNATUS* (VIPERIDAE — CROTALINAE)

Rubens Pinto CARDOSO JÚNIOR*
Luiz Antonio B. de Mello LULA*
Masao IWASAKI**
Sandra Maria de OLIVEIRA**

RESUMO: Os autores relatam o acompanhamento de um caso de ofiofagia em filhote de *Bothrops alternatus,* através do método radiológico para avaliação do tempo decorrido entre a ingestão e a eliminação total dos resíduos alimentares, bem como das vantagens da sua utilização, comparada com outros métodos.

UNITERMOS: Ofiofagia, serpente, *Bothrops alternatus*, Viperidae-Crotalinae.

INTRODUÇÃO

O processo digestivo em serpentes está relacionado ao tipo e à quantidade de alimento consumido [3,5,15,16], com a temperatura ambiente [10,17] e a ausência ou a presença de veneno inoculado na presa [19].

Vários métodos são utilizados para análise da digestão em répteis, entre eles, a avaliação direta do conteúdo estomacal na autópsia do animal [1,6,11,12,13], palpação do estômago para regurgitação do conteúdo estomacal [5,16], implantação de cânula no estômago [7,8], gastroendoscopia [18] e radiologia [3,5,16].

As descrições de casos de ofiofagia em serpentes estão restritas à citação do fato [2,4,9,14], nada abordando sobre o processo digestivo que sofrem as presas. O presente trabalho relata o acompanhamento de um caso em filhote de *Bothrops alternatus*, através de método radiológico, para avaliação do tempo decorrido entre a ingestão e a eliminação completa dos resíduos alimentares.

* Seção de Venenos — Instituto Butantan
** Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
Recebido para publicação em 20.11.1989 e aceito em 15.5.1990.

MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 23 serpentes, *Bothrops alternatus*, nascidas em cativeiro, na Seção de Venenos do Instituto Butantan em 02/04/88, foram agrupadas duas a duas em caixas de polipropileno. Após 22 dias de nascidas, foram alimentadas separadamente com camundongos albinos de um dia. Depois de alimentadas, as serpentes foram reagrupadas e mantidas em biotério com temperatura média de 23°C. Em uma das caixas foi constatado caso de ofiofagia, tendo um dos filhotes ingerido o outro.

O caso foi acompanhado por 12 radiografias da serpente e sua presa, nas posições lateral e dorso-ventral, sendo utilizada a técnica de 40 kv e 2,5 mAs em aparelho Chenonceaux CGR 300 mA.

RESULTADOS

A análise das radiografias mostrou que a ingestão da presa começou pela cauda (Figura 1).

Durante o processo de digestão da serpente ingerida, foi observado que até o 14º dia a ação das enzimas ocorreu a nível de tecido mole. Em seguida, foram constatadas modificações na disposição da coluna vertebral com enovelamento e sinais de perda de relação entre os ossos do crânio e da coluna (Figura 2). O processo acentuou-se e no 18º dia houve defecação da região caudal. Após o 27º dia, parte da coluna vertebral foi excretada (Figura 3). No 43º dia, o restante da coluna foi defecado juntamente com a parte do crânio não digerida, permanecendo no intestino apenas formações com densidades compatíveis a outros fragmentos ósseos. A excreção das partes ósseas não absorvidas ocorreu no 50º dia (Figura 4).

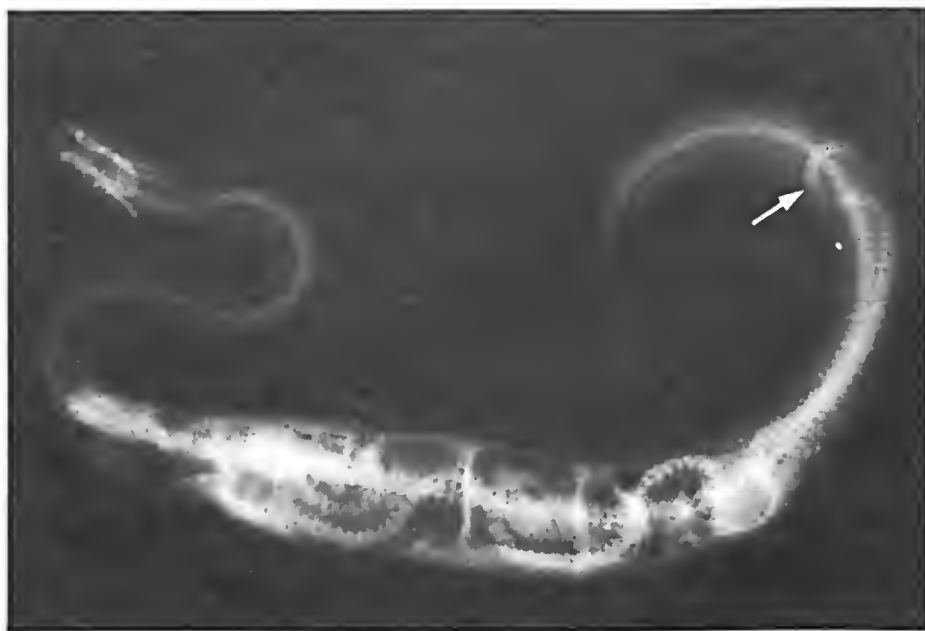



Fig. 1 — Ofiofagia em *Bothrops alternatus* jovem. Posição da presa no tubo digestivo da serpente ofiófaga.

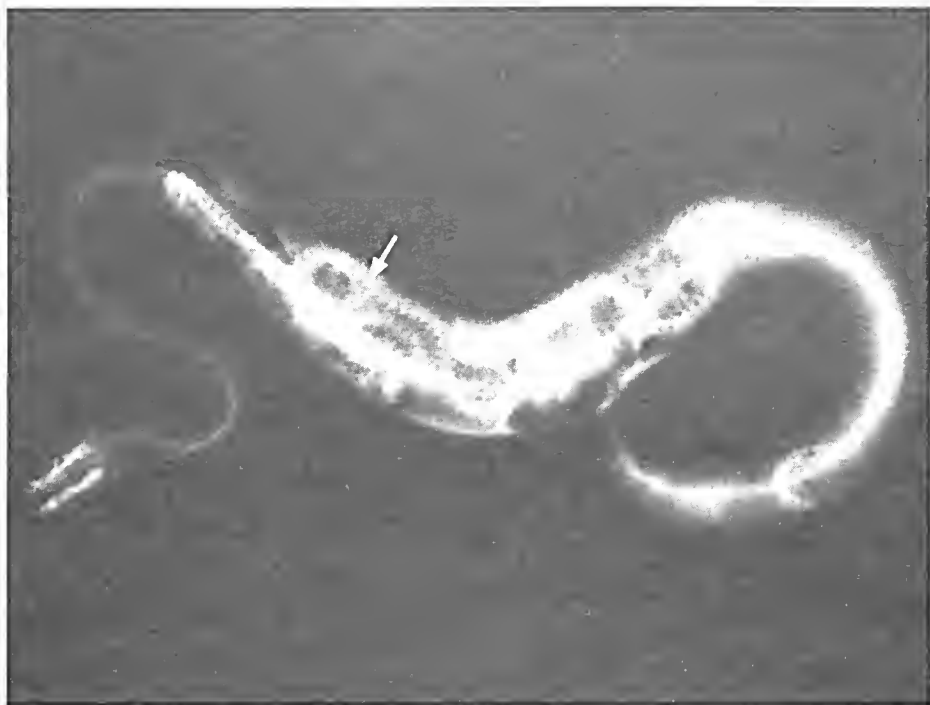



Fig. 2 — Enovelamento da presa e perda de relação entre os ossos do crânio e da coluna vertebral, no tubo digestivo da serpente ofiófaga.

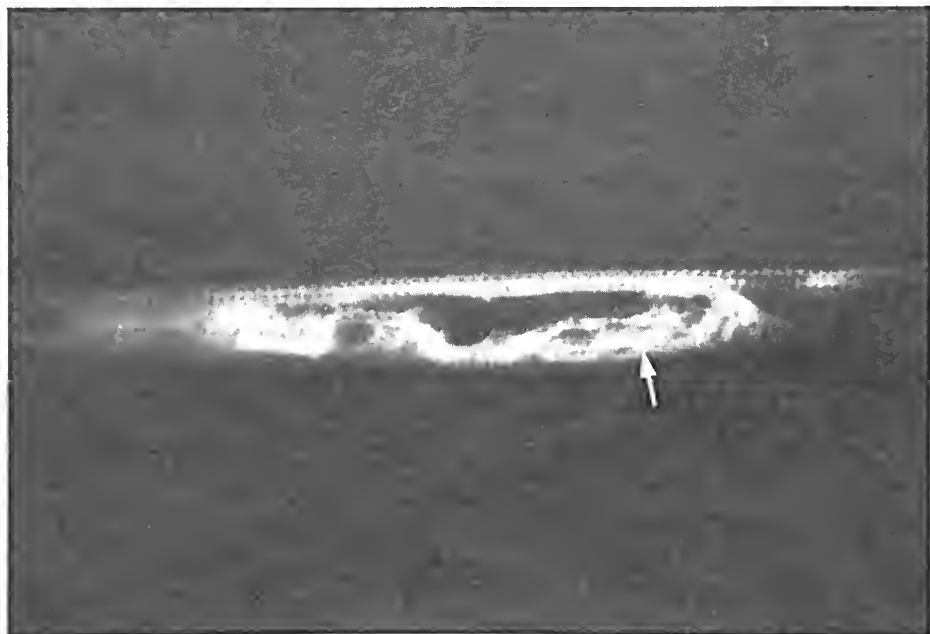



Fig. 3 — Acentua-se a perda de relação entre os ossos do crânio e da coluna vertebral; excreção da parte final da presa.

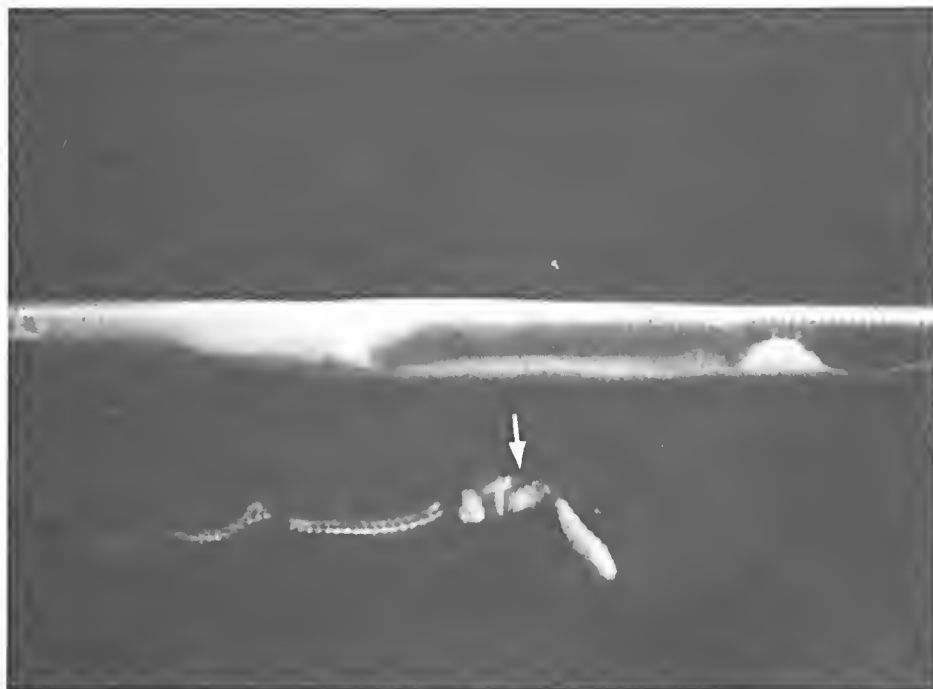



Fig. 4 — Excreção das partes ósseas não absorvidas, pela serpente ofiófaga.

COMENTÁRIOS E DISCUSSÃO

Casos de ofiofagia, que ocasionalmente ocorrem em laboratório, em geral são conseqüentes da disputa de alimento, quando duas serpentes mantidas em uma mesma caixa começam a ingerir um mesmo camundongo ou presa e terminam por uma ingerir a outra. Este fato não se verificou no caso presente, pois o filhote ofiófago, como registrado em radiografia (Figura 1), iniciou a ingestão da serpente irmã pela cauda.

Diversos autores citam que, na serpente, o processo de digestão total de uma presa varia de 01 a 14 dias, de acordo com a temperatura ambiente e o tipo de alimento ingerido [1,3,15,16,19]. Nas observações citadas acima, o final da digestão é marcado pela data da defecação [3], mas segundo Skoczylas [18], isto não deve ser levado em conta, pois muitos animais só defecam quando recebem a alimentação seguinte. No caso da ofiofagia, ora relatada, o tempo necessário para a passagem do alimento pelo trato digestivo foi de 50 dias, período considerado extremamente longo quando comparado com resultados obtidos por outros autores.

Segundo Blain e Campbell [3], o alimento ingerido por serpentes é retido no estômago até sua total digestão. No presente caso, o mesmo não ocorreu na totalidade, porque as proporções da presa acarretaram seu alojamento em parte do intestino. O que nele se encontrava sofreu digestão parcial, pois parte da cauda foi defecada no 18º dia.

CARDOSO JÚNIOR, R. P.; LULA, L.A.B. de M.; IWASAKI, M.; OLIVEIRA, S. M. de Análise radiológica na ofiofagia de filhote de serpente *Bothrops alternatus* (Viperidae — Crotalinae). **Mem. Inst. Butantan, 52** (2):63-68, 1990.

A utilização do método radiológico, no estudo da ofiofagia, comparado com outros métodos empregados, possibilitou a manipulação da serpente sem a utilização de anestésicos. Desta forma, o processo digestivo pode ser acompanhado sem traumatizar nem colocar em risco a vida do animal.

ABSTRACT: An instance of ophiophagy by a juvenile pit viper, *Bothrops alternatus,* in reported using X-ray as method for assessment of the time elapsed between ingestion and complete elimination of alimentary residues, as well as to affirm the advantages of its utilization when compared to other methods.

KEYWORDS: Ophiophagy, snake, *Bothrops alternatus,* Viperidae-Crotalinae.

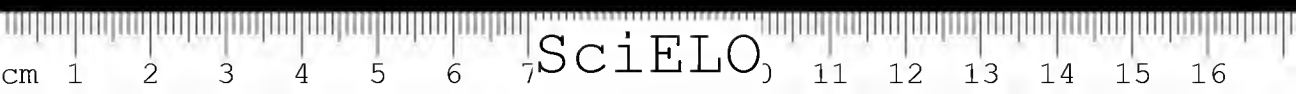
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALGAUHARI, A.E.I. Experimental studies on the blood sugar in reptiles. Effects of fasting, temperature and insulin administration in *Psammophis sibilans. Z. Vergl. Physiol. 54*: 395-399, 1967.
2. BARTON, A.J. Ophiophagy by a juvenile copperhead. *Copeia*, (3): 232, 1949.
3. BLAIN, A.W. & CAMPBELL, K.N. A study of digestive phenomena in snake with the AID of the Roentgen Ray. *Amer. J. Roentgenology Radiumtherapy, 48*(2): 229-239, 1942.
4. BRITES, V.L.C. Ofiofagia de *Bothrops moojeni* Hoge, 1961 (Ophidia, Viperidae) na natureza. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 14., Juiz de Fora, MG, 1987. *Resumos.* Juiz de Fora, 1987. p. 137.
5. BROWN, E.E. Feeding habits of the northen water snake *Natrix sipedon sipedon* Linnaeus. *Zoologica*, NY. *43*: 55-71, 1958.
6. CARPENTER, C.C. Comparative ecology of the common garter snake *(Thamnophis sirtalis sirtalis)*, Butler's garter snake *(Thamnophis butleri)* in mixed populations. *Ecological Monographs, 22* (4): 235-258, 1952.
7. DIEFENBACH, C.O.C. Gastric function in *Caiman crocodilus* (Crocodylia: Reptilia) — I. Rate of gastric digestion and gastric motility as a function of temperature. *Comp. Biochem. Physiol., 51*a: 259-265, 1975.
8. DIEFENBACH, C.O.C. Gastric function in *Caiman crocodilus* (Crocodylia: Reptilia) — II. Effects of temperature on ph and proteolysis. *Comp. Biochem. Physiol., 51*a: 267-274, 1975.
9. FEDERSONI JR., P.A.; BUONONATO, M.A.; PUORTO, G.; DE BIASI, P. *Bothrops insularis* — Exame de conteúdo estomacal de um jovem (Serpentes: Viperidae: Crotalinae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 14., Juiz de Fora, MG, 1987. *Resumos.* Juiz de Fora, 1987. p. 138.
10. HENDERSON, R.W. Feeding behavior, digestion and water requirements of *Diadophis punctatus arnyi* Kennicott. *Herpetologica, 26*(4): 520-526, 1970.
11. KEENLYNE, K.D. Sexual differences in feeding habits of *Crotalus horridus horridus. J. Herpetol., 6*: 234-237, 1972.
12. KEENLYNE, K.D. & BEER, J.R. Food habits of *Sistrurus catenatus catenatus. J. Herpetol., 4*: 382-384, 1973.
13. MACARTNEY, J.M. Diet of the Northen Pacific rattlesnake, *Crotalus viridis oreganus*, in British Columbia. *Herpetologica, 45*(3): 299-304, 1989.
14. PUORTO, G. & CORDEIRO, C.L. *Leptodeira annulata annulata* (Linnaeus, 1758) como conteúdo estomacal de *Bothrops atrox* (Linnaeus, 1758) (Serpentes). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 14., Juiz de Fora, MG, 1987. *Resumos.* Juiz de Fora, 1987. p. 136.
15. ROOT, H.D. Gastric digestion with hypothermia. Observation and applications. Thesis, Univ. Minnesota, 1961.
16. SKOCZYLAS, R. Influence of temperature on gastric digestion in the grass snake, *Natrix natrix L. Comp. Biochem. Physiol., 33*: 793-804, 1970.

CARDOSO JÚNIOR, R. P.; LULA, L.A.B. de M.; IWASAKI, M.; OLIVEIRA, S. M. de Análise radiológica na ofiofagia de filhote de serpente *Bothrops alternatus* (Viperidae — Crotalinae). Mem. Inst. Butantan, **52** (2):63-68, 1990.

17. SKOCZYLAS, R. Salivary and gastric juice secretion in the grass snake, *Natrix natrix* L. *Comp. Biochem. Physiol. 35*: 885-903, 1970.

18. SKOCZYLAS, R. Physiology of the Digestive Tract. In: GANS, C. ed. *Biology of the Reptilia.* Physiology B. London/New York, Academic Press, 1978. V. 8. p. 589-717.

19. THOMAS, R.G. & HARVEY-POUGH, F. The role of snake venom in prey digestion. *Amer. Zool., 17*(4): 947, 1977.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

1. Somente serão aceitos trabalhos inéditos e que se destinem exclusivamente à revista. É proibida a reprodução com fins lucrativos. Os artigos de revisão serão publicados a convite da Comissão Editorial.
2. Os trabalhos deverão ser redigidos em português, inglês ou francês, datilografados preferencialmente em máquina elétrica, em espaço duplo em 3 (três) vias, em papel formato ofício e numerados no ângulo superior direito.
3. No preparo do original será observada, sempre que possível, a seguinte estrutura: **Página de rosto**: título do artigo, nome(s) do(s) autor(es) e filiação científica. **Texto**: introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusões, agradecimentos e referência bibliográfica. **Material de referência**: resumos (em português e inglês); unitermos (palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo; devem ser incluídas até um limite máximo de três, em português e inglês).
4. As referências bibliográficas deverão ser ordenadas alfabeticamente e numeradas.
   Exemplos:
   Para livros: autor, título, edição, local de publicação, editor, ano, páginas.
   7. BIER, O. Microbiologia e imunologia. 24.ed. São Paulo, Melhoramentos, 1985. 1234p.
   Para artigos: autor, título do artigo, título do periódico, volume, página inicial e final, ano.
   8. MACHADO, J.C. & SILVEIRA F.º, J.F. Obtenção experimental da pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpiônico. **Mem. Inst. Butantan, 40/41**: 1-9, 1976/77.
   As citações no texto devem ser por números-índices correspondentes às respectivas referências bibliográficas.
   Exemplos:
   ... método derivado de simplificação de armadilha de Disney[1]
   ... segundo vários autores[2,3,4]
5. As ilustrações (fotos, tabelas, gráficos etc.) deverão ser originais e acompanhadas de legendas explicativas. As legendas serão numeradas e reunidas em folha a parte. Os desenhos deverão ser a nanquim e as fotografias bem nítidas, trazendo no verso o nome do autor e a indicação numérica da ordem a ser obedecida no texto. As ilustrações deverão ser organizadas de modo a permitir sua reprodução dentro da mancha da revista (22 x 12,5cm).

6. Os artigos deverão conter no máximo 6 (seis) ilustrações (branco e preto). De cada trabalho serão impressas 50 (cinqüenta) separatas, sendo 10 para a Biblioteca do Instituto e 40 para os autores.
7. Os textos originais não serão devolvidos e os originais das ilustrações estarão à disposição dos autores.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

1. Manuscripts submitted to the Editorial Board should be unpublished texts and should not be under consideration for publication elsewhere. Reproduction for commercial purposes is not allowed. The Editorial Board will plan the publication of revision articles.
2. The original and two copies of papers should be typewritten in Portuguese, English or French, double spaced, on typing paper (31 x 21cm). Pages should be numbered consecutively at the upper right corner.
3. The following structure should be considered in the preparation of the manuscript: **Title page**: with article title, name of author(s), professional address. **Text**: with introduction, material and methods, results, discussion, conclusions, acknowledgments, references, abstracts (in Portuguese and English), and keywords. A maximal number of 03 keywords should be included in Portuguese and English.
4. References in alphabetical order should be numbered consecutively.
   Examples:
   Books
   7. BIER, O. Microbiologia e imunologia. 24.ed. São Paulo, Melhoramentos, 1985. 1234p.
   Articles
   8. MACHADO, J.C. & SILVEIRA F.º, J.F. Obtenção experimental da pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpiônico. **Mem. Inst. Butantan, 40/41**: 1-9, 1976/77.
   Citations in the text should be identified by the reference number.
   Examples:
   ... método derivado de simplificação de armadilha de Disney[1]
   ... segundo vários autores[2,3,4]
5. Illustrations (photographs, tables, figures etc.) should be the originals and legends should be submitted typewritten on a separate sheet. Line-drawings should be with China ink and photographs must be of top quality. On the back of each figure or photograph the name of the author(s) should be lighly written and the number indicating the sequence in the text. Illustrations should fit in a page measuring 22 x 12,5cm.
6. No more than 6 illustrations will be accepted and photographs should be black and white. Fifty reprints of each article are provided without charge, and 10 will be kept at the library.
7. Submitted manuscripts will not be returned to the author(s) but the original illustrations are available to author(s) by request.